

機関番号：24302

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500712

研究課題名 (和文) コラーゲンペプチド摂取による機能性メカニズム解明システムの開発

研究課題名 (英文) Establishment of system to elucidate mechanism for beneficial effect of collagen peptide by ingestion.

研究代表者

佐藤 健司 (SATO KENJI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00202094

研究成果の概要 (和文) : 本研究により新規の線維芽細胞増殖促進効果のある食事由来コラーゲンペプチド Hyp-Gly を見いだすことができた。さらにマウス皮膚より遊走してきた線維芽細胞は、ペプチドトランスポーターPEPT1, 2 を発現しているが、継代により急激にその発現が減少することを見いだした。これらの知見は初代培養線維芽細胞が継代細胞よりもコラーゲンペプチドの細胞増殖促進活性を受けやすいこととの関係が示唆される。

研究成果の概要 (英文) : A novel food-derived collagen peptide; Hyp-Gly was identified in the human peripheral blood. Hyp-Gly stimulated growth of primary cultured fibroblast on collagen gel. The present study also demonstrated that fibroblast migrated from mouse skin expressed peptide transporter 1 and 2 (PEPT1, 2). However, expression of PEPT1, 2 dramatically decreased after several passages. These facts suggest that absorption of the collagen peptide through PEPT1,2 might play significant role in cell proliferation by collagen peptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活科学

キーワード：コラーゲン、Pro-Hyp、線維芽細胞、ペプチド、皮膚

## 1. 研究開始当初の背景

(1) コラーゲンペプチドの摂取によりヒト試験および動物試験で皮膚や関節の状態の改善効果が示唆されていたが、そのメカニズムは全く不明であった。

(2) 我々の研究により、コラーゲンペプチド摂取によりヒト末梢血中にヒドロキシプロリンを持つペプチドが存在することを見いだした。しかし、親水性の短鎖ペプチドの分離が悪く、まだ未知のペプチドが存在する可

能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト血中に存在する食事由来コラーゲンペプチドの網羅的な解析法の開発

(2) (1)を用いて同定したヒト血中の食事由来コラーゲンペプチドの線維芽細胞への作用の解明

### 3. 研究の方法

- (1) 親水性短鎖ペプチドの逆相 HPLC での分離の改善のためフェニルイソチオシアネートで誘導し、誘導体を分離後エドマン分解で配列分析を行う。
- (2) マウス皮膚から遊走してきた線維芽細胞数におよぼすコラーゲンペプチドの影響を評価する。
- (3) マウス皮膚から遊走してきた線維芽細胞をプラスチックまたはコラーゲングル上で培養し、コラーゲンペプチドの増殖効果について評価する。
- (4) マウス皮膚から遊走してきた線維芽細胞を継代し、ペプチドトランスポーター PEPT1, 2 の発現を RT-PCR 法により評価する。

### 4. 研究成果

- (1) 新たに開発したフェニルイソチオシアネートによるプレカラム誘導化法により、従来は逆相カラムに保持できないため分離が困難であった Hyp-Gly 等の食事由来コラーゲンペプチドをヒト末梢血から分離同定することに成功した。本法はコラーゲン以外の食事由来ペプチドの分離・同定にも有益であった。本法を用いてヒト血中の食事由来エラスチンペプチドの同定にも成功している。

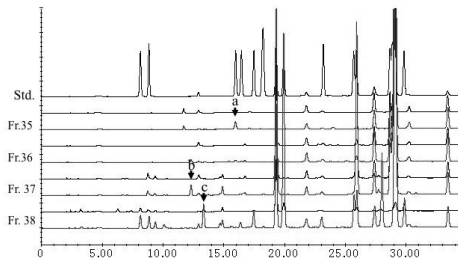


図2. 被験者1-4Mの摂取前(黒)と摂取後1時間のゲル濾過画分35-38のPTC-逆相HPLCパターン。矢印a; Pro-Hyp, b; Hyp-Gly, c; Hyp. Std;アミノ酸標準物。

- (2) これまでに同定した食事由来コラーゲンペプチドの血中濃度を LC-MS/MS 法により定量した。その結果、我々が同定したペプチドは血中に MS/MS 法でも検出することができ、またその濃度は 20 g/60 kg 体重の摂取で数  $\mu\text{M}$  から 60  $\mu\text{M}$  に達し、従来の食事由来ペプチド濃度と比べ 10,000 倍程度高い値であった。この事実はペプチドは吸収後速やかにアミノ酸になるといった従来の栄養学の常識を覆すペプチドが存在することを明確に示している。
- (3) マウスの皮膚を培養し、培地に Pro-Hyp を添加したところ、皮膚より遊走してくる線維芽細胞の数が有意に増加した。この現象は構成アミノ酸である Pro および Hyp では観察されず、ペプチドとしての機能であると考えられる。線維芽細胞は傷の修復時に損傷箇所

に遊走し、コラーゲンを合成して傷の修復を行う。この現象は食事由来コラーゲンペプチドが傷の修復を促進する可能性を示唆する。

- (4) マウス皮膚より遊走してきた線維芽細胞はプラスチック上では非常に早く増殖し、Pro-Hyp および Hyp-Gly の影響はほとんど受けなかった。一方、コラーゲングル上では成長因子存在下でも増殖が抑制された。ここにコラーゲン由来ペプチドを添加すると増殖が促進された。この効果は Hyp-Gly の方が高かった。この結果は食事由来のコラーゲンペプチドがコラーゲンを合成する線維芽細胞の増殖を促進することを始めて明らかにしたものである。

- (5) マウス皮膚より遊走してきた線維芽細胞をトリプシン処理により回収し、継代培養した。初代培養および継代培養した線維芽細胞に発現する PEPT1, 2 を RT-PCR 法により検討した。その結果初代培養細胞には PEPT1, 2 が発現していたが、継代によりその発現量は劇的に減少した。この現象は初代培養細胞がコラーゲンペプチドの増殖促進効果に良く反応することとの関連が示唆される。また細胞内に取り込まれコラーゲンペプチドが増殖促進効果に関連することを示唆する。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Shigemura, Y., Akaba, S., Kawashima, E., Park E.-Y. Nakamura, Y., Sato, K. Identification of a novel food-derived collagen peptide, hydroxyprolyl- glycine, in human peripheral blood by pre-column derivatisation with phenyl isothiocyanate. Food Chemistry In press. 査読有 2011.
- ② Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., Sato, K. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate. 査読有 Int. J. Food Sci. Nutri. 61, 2010, 52-60.
- ③ 重村泰毅, 佐藤健司 コラーゲンペプチド経口摂取による生理機能とそのメカニズム 査読なし 食品加工技術 30, 2010,1, 1-7.
- ④ 佐藤健司 アンチエイジングにおける機能性ペプチドの応用 査読なし

Functional Food 4 (1), 2010, 67-71.

- ⑤ 佐藤健司 高付加価値食品開発のための経口摂取により活性を持つペプチドの同定 査読なし New Food Industry 52 (9), 2010, 12-20.
- ⑥ Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C. Taira, T., Park, E. Y., Nakamura, Y., Sato, K. Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. 査読有 J. Agric. Food Chem., 57 (2), 2009, 444-449.
- ⑦ Sato, K., Iwai, K., Aito-Inoue, M. Identification of food-derived bioactive peptides in blood and other biological samples. 査読有 J. AOAC Int. 91 (4), 2008, 995-1001.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Sato, K. Impact of extracellular matrix protein hydrolysates on human health. 102nd AOCs Annual Meeting & Expo. Cincinnati, USA, May 3. 2011.
- ② Sato, K. Identification of Food-derived peptides in human peripheral blood -Good candidate for active peptide with health-promotion activity-. PepCon 2010, Beijing, China, March 22, 2010.
- ③ Sato, K. Occurrence of Food-Derived Peptides with Biological Activity in Human Blood. Annual Meeting of International Society for Nutraceuticals and Functional Foods, San Francisco, Nov.3, 2009.
- ④ Sato, K. Occurrence of Food-Derived Peptides with Biological Activity in Human Blood. 3rd International Congress on Food and Nutrition, Antalya Turkey, April 24. 2009.
- ⑤ Sato, K. Subject to subject change in composition of food-derived collagen peptides in human peripheral blood after ingestion of enzymatic digest of gelatin. Institute of Food Technologist Annual Meeting, New Orleans, USA. 2008 July 29.

[図書] (計 1 件)

- ① Sato, K. and Shigemura, Y. CRC Press, Marine Cosmeceuticals: Latest Trends and Prospects, 共著 印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.senryaku-kyoto.jp/contents/search/index.php?mode=show&seq=1165>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 健司 (SATO KENJI)

研究者番号：00202094

(2) 研究分担者

重村 泰毅 (SHIGEMURA YASUTAKA)

研究者番号：20373178

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：